









# **Exhibit 1**

**Combination therapy comprising cloretazine(tm)**

**Publication number:** CN101014353  
**Publication date:** 2007-08-08  
**Inventor:** LI-MOU KING IVAN SZNOL MARIO B (US)  
**Applicant:** VION PHARMACEUTICALS INC (US)  
**Classification:**  
- **international:** **A61K38/00; A61K38/00;**  
- **European:** A61K31/7088; A61K31/185  
**Application number:** CN20058009262 20050325  
**Priority number(s):** US20040556565P 20040326

**Also published as:**

 WO2005094282 (A3-corr)  
 WO2005094282 (A3)  
 WO2005094282 (A2)  
 EP1804816 (A3-corr)  
 EP1804816 (A3)  
 EP1804816 (A2)  
 US2008025984 (A1)  
 EP1804816 (A0)

less &lt;&lt;

**Report a data error here****Abstract of CN101014353**

This invention provides a method for treating tumor in a subject comprising administering to the subject an effective amount of: (1) VNP40101M, or its equivalent; and (2) a nucleoside, or a nucleoside analog. This invention also provides a method for inhibiting tumor cell growth comprising contacting the tumor cell with effective amounts of: (1) VNP40101M, or its equivalent; and (2) a nucleoside, or a nucleoside analog. The present invention relates to the treatment of cancer, comprising administering to a subject in need thereof an effective amount of VNP40101M in combination with a nucleoside.

.....  
Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580009262.3

[51] Int. Cl.

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 38/04 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 8 月 8 日

[11] 公开号 CN 101014353A

[22] 申请日 2005.3.25

[21] 申请号 200580009262.3

[30] 优先权

[32] 2004.3.26 [33] US [31] 60/556,565

[86] 国际申请 PCT/US2005/010152 2005.3.25

[87] 国际公布 WO2005/094282 英 2005.10.13

[85] 进入国家阶段日期 2006.9.22

[71] 申请人 维奥恩药品公司

地址 美国康涅狄格州

[72] 发明人 敬祥林 M·斯诺 M·贝尔库特  
郑立谋

[74] 专利代理机构 南京天华专利代理有限责任公司  
代理人 徐冬涛 夏平

权利要求书 2 页 说明书 15 页

[54] 发明名称

包含 Cloretazine<sup>TM</sup> 的治疗组合物

[57] 摘要

本发明提供了一种治疗患者肿瘤的方法，其包含给患者施用有效量的：(1) VNP40101M，或其等价物；和(2)核苷，或核苷类似物。本发明还提供了一种抑制肿瘤细胞生长的方法，包括将肿瘤细胞接触有效量的：(1) VNP40101M，或其等价物；和(2)核苷，或核苷类似物。本发明涉及癌症的治疗，包含给患者施用其所需的有效量的与核苷组合的 VNP40101M。

- 1、一种治疗患者肿瘤的方法，其包含给患者施用有效量的：  
(a) VNP40101M，或其等价物；和 (b) 核苷，或核苷类似物。
- 2、一种抑制肿瘤细胞生长的方法，其包含将肿瘤细胞接触有效量的：  
(a) VNP40101M，或其等价物；和 (b) 核苷，或核苷类似物。
- 3、根据权利要求 1 或 2 的方法，其中核苷为 AraC (阿糖胞苷)、氮胞苷、克拉屈滨 (cladribine)、地西他滨 (decitabine)、吉西他滨 (gemcitabine)、颈基嘌呤、硫鸟嘌呤、氟达拉滨 (fludarabine)、氯法拉滨 (clofarabine)、troxacitabine 或戊糖苷。
- 4、根据权利要求 1 或 2 的方法，其中肿瘤是固体恶性肿瘤、白血病或淋巴瘤。
- 5、根据权利要求 1 或 2 的方法，其中 VNP40101M 和核苷可以同时或连续给药。
- 6、根据权利要求 1 的方法，其中 VNP40101M 和核苷静脉注射、皮下或口服给药。
- 7、一种治疗癌症的方法，其包含给患者施用其所需的有效量的 VNP4010M 和核苷。
- 8、根据权利要求 7 的方法，其中癌症是白血病和核苷是 AraC。
- 9、根据权利要求 7 的方法，其中癌症是白血病和核苷是氯法拉滨。
- 10、根据权利要求 8 或 9 的方法，其中白血病是急性骨髓白血病。
- 11、根据权利要求 8 的方法，其中 VNP40101M 的剂量为  $100-1000\text{mg}/\text{m}^2$  和 AraC 的剂量为  $500-5000\text{mg}/\text{m}^2$ 。
- 12、一种治疗患者肿瘤的方法，其包含给患者施用：  
(a) 有效量的 VNP40101M，或其等价物；和 (b) 其它抗肿瘤治疗。
- 13、一种抑制肿瘤生长的方法，其包含将肿瘤细胞接触：  
(a) 有效量的 VNP40101M，或其等价物；和 (b) 其它抗肿瘤治疗。
- 14、根据权利要求 12 或 13 的方法，其中其它的抗肿瘤治疗是放射治疗或施用其它化疗药剂。
- 15、根据权利要求 14 的方法，其中化疗药剂是抗代谢物、依托泊苷、阿

- 霉素、紫杉酚、长春新碱、环磷酰胺、丝裂霉素 C、拓扑异构酶 I 和拓扑异构酶 II 抑制剂（阿霉素、拓扑替康（topotecan）、喜树碱（camptothecin）和药薯）、顺氯氨铂、卡铂（carboplatin）、替匹法尼（tipifarnib）（R115777）、SCH66336、埃罗替尼（erlotinib）、吉非替尼片（gefitinib）、或吉妥单抗（gemtuzumab ozogamicin）。
- 16、根据权利要求 1-2、6-12 和 14-15 任一项的方法，其中患者是人。
- 17、一种组合物，其包含一定量的与核苷组合使用治疗肿瘤时能够产生协同作用的 VNP40101M。
- 18、一种组合物，其包含一定量的与 VNP40101M 组合使用治疗肿瘤时能够产生协同作用的核苷。

## 包含 Cloretazine™ 的治疗组合物

本申请受益于2004年3月26日申请的美国系列申请号:60/556,565,将前述申请在此全部作为参考并入本申请。

贯穿本申请,参考了各种出版物。这些出版物的全部公开内容在此作为参考并入本申请以更全面地描述本申请所属领域的技术状态。

### 技术领域

本发明涉及包含 Cloretazine™ 的治疗组合物。本发明还涉及 Cloretazine™ 和核苷的协同作用。

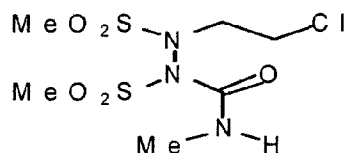
### 背景技术

烷化剂是目前用于治疗各种恶性肿瘤的最有效的药物之一,并且被广泛用于临床(Katzung, 基础及临床药理学,第七版,1998,Appleton & Lange, Stamford, 881),高细胞毒性是由于其具有导致DNA链间交联因而抑制复制的能力(Rajski a 和 Williams, 化学评论,1998, 98:2723)。在烷化剂中,CNU(氯乙基亚硝基脲)族已经被广泛地应用于临床治疗脑肿瘤、结肠癌和淋巴瘤(DeVita 等, 癌症研究,1965, 25:1876; 和 Nissen 等, 癌症,1979, 43:31),然而,由于迟发的和累积的骨髓机能降低和肝毒性限制了它们的临床应用(Panasci 等, 癌症研究,1977, 37:2615; 和, Gibson 与 Hickman, 生化药理学,1982, 31:2795)。

由CNUs产生的许多具有生成氯乙基化和甲氨酰化类但不能生成羟乙基化和乙烯化类的1,2-二(磺酰基)胍的药物前体(SHPs)最近被开发了出来(Sartorelli 等,参见美国专利号: 6,040,338; 美国专利号: 5,637,619; 美国专利号: 5,256,820; 美国专利号: 5,214,068; 美国专利号: 5,101,072; 美国专利号: 4,849,563; 和美国专利号: 4,684,747)。抗肿瘤活性也已经提出是由DNA的氯乙基化和后交联产生(Kohn, 癌症研究的最近成果,Eds. Carter 等,1981, Springer, Berlin,

vol.76:141; 和 Shealy 等, 药物化学期刊, 1984, 27:664)。甲氨酰化类(也就是异氰酸酯)能够与蛋白质上的巯基和胺官能团反应并抑制 DNA 聚合酶 (Baril 等, 癌症研究, 1975, 35: 1)、DNA 链断裂的修复 (Kann 等, 癌症研究, 1974, 34:398) 和 RNA 合成及其加工 (Kann 等, 癌症研究, 1974, 34:1982)。无论如何, DNA 的羟乙基化是致癌的和/或诱变的事件 (Swenson 等, J Natl Cancer Inst., 1979, 63:1469)。

1,2-二(甲磺酰基)-1-(2-氯乙基)-2-(甲氨基羰基)胍 (VNP40101M, Cloretazine™), SHP 族中的最新的前导化合物, 对宿主具有低毒性, 而且与氯乙基亚硝基脲 (CNU) 衍生物和其它 SHP 类似物相比, 对 L1210 鼠白血病、L1210/BCNU、L1210/CTX、L1210/MEL (1,3-二(2-氯乙基)-1-亚硝基脲, 环磷酰胺和苯丙氨酸抗性亚系)、P388 白血病、M109 肺癌、B16 黑素瘤、C26 结肠癌和 U251 神经胶质瘤具有更好的抗肿瘤活性 (Shyam 等, 药物化学期刊, 1999, 42:941)。另外, VNP40101M 在越过脑血管屏障 (BBB) 和根除颅内植入的白血细胞 (>6.54 对数细胞杀死量)、对抗 BCNU 效力是有效果的 (Finch 等, 癌症生化生物物理学, 2001, 61: 3033)。



V N P 4 0 1 0 1 M

VNP40101M 的抗肿瘤活性可能归因于 90CE 和甲基异氰酸酯的释放。90CE 进一步分裂产生甲基 2-氯乙基重氮砷 (1), 参考美国专利号 6,855,695 中的图 1, 相对特异性的 O<sup>6</sup>-鸟嘌呤氯乙基因子 (chloroethylator), 鸟嘌呤 N<sup>7</sup> 位少量的烷基化产生 (Penketh 等, 药物化学期刊, 1994, 37:2912; 和 Penketh 等, 生化药学, 2000, 59: 283)。由 VNP40101M 释放的甲基异氰酸酯具有抑制各种 DNA 修复酶的能力, 这些酶包括使 DNA 中 O<sup>6</sup>-烷基鸟嘌呤单烷基类稳定的 O<sup>6</sup>-烷基鸟嘌呤-DNA 烷基转移酶 (Baril 等, 癌症研究, 1975, 35: 1)。

#### 在鼠肿瘤模型中的活性

VNP40101M 已经显示了对模型鼠中的白血病和固体同源及人异种移植肿瘤的广泛的抗肿瘤活性 (Shyam 等, 药物化学期刊, 28:525-7, 1985; Shyam 等, 药物化学期刊, 29:1323-5, 1986; Shyam 等, 药物化学期刊, 30:2157-61, 1987; Shyam 等, 药物化学期刊, 36:3496-502, 1993; Shyam 等, 药物化学期刊, 39:796-801, 1996)。资料简要概括如下:

1. 抗腹膜内 (IP) 植入的 L1210 白血病 ( $10^6$  肿瘤细胞), 该白血病对 1,3-二 (2-氯乙基) -1-亚硝基脲 (BCNU)、环磷酰胺、或苯丙氨酸具有抗性, 肿瘤接种 (20-60mg/kg, 或 60-180mg/m<sup>2</sup>) 后 24 小时单次剂量腹膜内施药 VNP40101M 对小鼠具有 100% 治愈 (生存期  $\geq 60$  天)。能够在敏感和抗性的具有 L1210 的小鼠上产生长期存活的 VNP40101M 剂量当施药于非肿瘤的小鼠中时仅仅是适当的骨髓抑制。一些动物施用更高的单次剂量 (80-100mg/kg) 治疗多于 50 天后产生消瘦状态体征和死亡。当连续 6 天每天腹膜内施用 6mg/kg/d 剂量的 VNP40101M (总剂量为 36mg/kg) 治疗的小鼠相对于标准小鼠增加了 333% 的生存期限, 而施用剂量为 12-18mg/kg/d (总剂量为 72-108mg/kg) 对动物的治愈为 100%。用 d $\times$ 6 日程表并没有发现延迟的毒性死亡, 但是总剂量高于 108mg/kg 的情况并没有试验。
2. 抗裸鼠内的约 300mg 的人 U251 神经胶质瘤的皮下肿瘤, 以 10mg/kg q2d $\times$ 11 或 20mg/kg q4d $\times$ 6 腹膜内施药 VNP40101M 导致肿瘤完全的消退。
3. 抗皮下种植的约 150mg 的鼠 M109 肺癌, 以 10 mg/kg q2d $\times$ 10 或 20 mg/kg q4d $\times$ 5 腹膜内施药 VNP40101M 延迟了肿瘤生长, 用后一个日程表经 14 天延迟时间使肿瘤达到 1g。
4. 通过腹膜内每周给药 VNP40101M 来抗同源 B16F10 黑素瘤、人 HTB177 肺 (H460) 和 WiDr 结肠癌细胞系产生显著的肿瘤生长延迟, 10 - 60 mg/kg 的剂量是有效的, 但是高剂量产生更强的生长抑制。
5. 通过腹膜内给药抗颅内植入的 L1210 白血病发现了 VNP40101M 的皮下抗肿瘤活性, 证明其通过血脑屏障的良好穿透能力。



### 毒性研究

在正常的 CD2F1 小鼠内检验了 VNP40101M 剂量和白血细胞量 (WBC) 之间的关系。用单次腹膜内施药剂量 40 mg/kg (120 mg/m<sup>2</sup>) 发现了最适当的白血球减少症 (基准的 50%)。完全恢复的情况下, 60-80 mg/kg 剂量的 VNP40101M 施药 4 天和 21 天分别减少 WBC 的量到基准的约 25% 和 15%。如在 1.2.A 部分所述, 80-100 mg/kg 的高单次剂量腹膜内施药给具有肿瘤的小鼠, 在治疗存活 50 天后产生消瘦体征和死亡。

在大鼠体内进行的毒性研究。根据 d×5 剂量日程表静脉注射 (IV) 给药 3 mg/kg (18mg/m<sup>2</sup>), 在 15 天的时候没有产生临床体征和征状, 但是在 29 天的时候 2/10 的大鼠具有肺部发现, 包括少量的胸腔液体和肺衰竭至塌陷。在 3 mg/kg (d×5) 剂量水平的显微发现主要限于肺部, 包括肺泡水肿、充血、肺泡组织细胞增多病, 和血管血栓。10 mg/kg (60 mg/m<sup>2</sup>) d×5 的高剂量在 15 天时产生很少显著的肉眼体检发现, 但是 29 天的时候在大约 50% 的动物胸腔发现液体和在 30、31 天分别有 6 只动物死亡。肺部组织病理学的发现与 3mg/kg 剂量水平相似。在与 10mg/kg d×5 一样高的剂量下, 没有发现脊髓压迫。血清化学的影响仅限于总蛋白和清蛋白的减少, 在 10 mg/kg 剂量组的第 29 天发现该影响。

在狗体内进行的毒性研究, 以 1、3、10 和 30mg/kg 的单次剂量静脉注射施药。1 和 3 mg/kg 具有很好的耐受性并且在至少 21 天才发现产生了微小的临床体征。10 和 30mg/kg (分别为 200 和 600mg/m<sup>2</sup>) 的高剂量产生了显著的临床体征, 还有实验室异常, 其包括碱性磷酸酶增加、白蛋白降低、胆红素增加、肌酸磷酸激酶增加、和白血细胞、红血细胞量降低。还确定了 d×5 静脉注射 0.3、1 和 3mg/kg 的剂量的毒性。3 mg/kg d×5 的剂量产生了显著的临床体征, 包括活动减少、大便失禁、厌食和轻微的脱水, 8 天的时候有动物开始死亡。经过 8 天还表现了显著的白细胞减少和碱性磷酸酯酶轻微升高。1mg/kg (20mg/m<sup>2</sup>) d×5 的剂量在 8 天的时候产生微小的临床体征和征状, 和仅有的轻微的白细胞减少而且经过 15 天恢复到基准值。

### VNP40101M 的 I 阶段研究

在具有晚期固体肿瘤或血液学恶性肿瘤的患者中实施了 VNP40101M

的两次 I 期试验研究。在第一次 I 期试验中，26 个具有晚期固体肿瘤的患者接受了 15—30 分钟以上的静脉注射，剂量水平为每 4-6 周 3-305mg/m<sup>2</sup>。最大耐受剂量（MTD）为 305mg/m<sup>2</sup>。在以最大耐受剂量治疗的 7 名患者中，6 名患者血小板减少到 3 级。血小板最低点发生在 25-33 天。以最大耐受剂量治疗患者中的 5 名出现血小板减少大于等于 2 级，但是仅有 1 名患者为 3 级。血液学毒性在第 32-45 天的时候恢复到小于等于 1 级。观察到了没有剂量限制的非血液学毒性。

第二次 I 期试验是在 MD 安德森肿瘤中心（MD Anderson Cancer Center）对具有晚期血液学恶性肿瘤的患者实施的。28 名具有复发或顽固性白血病患者（20 名急性骨髓白血病（AML）、3 名骨髓发育不良，1 名处于胚细胞转变期的慢性骨髓白血病，3 名急性淋巴细胞白血病，1 名淋巴细胞白血病）接受了剂量为 220-708mg/m<sup>2</sup> 的治疗研究。虽然发现了 708mg/m<sup>2</sup> 剂量、非剂量限制的非血液学毒性。但在剂量大于等于 400mg/m<sup>2</sup> 时，患者出现了短暂的输注相关综合症，包括头疼、恶心、呕吐、肌疼/痛性痉挛，面部发红、头晕、心动过速、和低血压。输注相关的反应具有自身局限性并且所有的患者在其完成治疗的几个小时后都消退了。在以 708mg/m<sup>2</sup> 治疗的 7 名患者中，1 名患者出现长时间骨髓发育不全（>80 天）且没有白血病迹象。因此，在 708mg/m<sup>2</sup> 剂量骨髓抑制可能是一种剂量限制的毒性（DLT）。另外一批患者目前正在以 600mg/m<sup>2</sup> 的过渡剂量进行评价。

在晚期血液学肿瘤患者中发现了抗肿瘤的证据。一位早期未治疗的高危骨髓发育不良患者在单次剂量施药 300mg/m<sup>2</sup> 的 VNP40101 后经 28 天发生完全性反应。而没有其它的患者获得完全的缓解，在所有的剂量水平，大部分患者至少暂时通过 VNP40101M 减少了外周血胚细胞。另外，治疗前严重的 AML 患者通过 220mg/m<sup>2</sup> 的剂量基本清除了骨髓胚细胞和消散了齿龈白血病浸润，和以 532 mg/m<sup>2</sup> 剂量治疗的 AML 患者经过 28 天已经减少了骨髓胚细胞和提高了嗜中性白血细胞的量。单独的和组合的 VNP40101M 的活性水平保证在 AML 患者中对其进一步探测。

## 发明内容

本发明的目的是：

提供一种治疗患者肿瘤的方法，包括给患者施用有效量的：

(1) VNP40101M，或其等价物；和(2)核苷，或核苷类似物。

本发明还提供一种抑制肿瘤细胞生长的方法，包括将肿瘤细胞接触有效量的：(1) VNP40101M，或其等价物；和(2)核苷，或核苷类似物。

本发明涉及癌症的治疗，包括给患者施用其所需的有效量的 VNP40101M 与核苷的组合物。

本发明提供了一种组合物，其包含相当数量的与核苷组合使用治疗肿瘤时产生增效作用的 VNP40101M。

本发明提供了一种组合物，其包含相当量的与 VNP40101M 组合使用治疗肿瘤时产生增效作用的核苷。

本发明提供了一种组合物，其包含相当量的与 VNP40101M 组合使用治疗肿瘤时产生增效作用的抗癌药剂。

本发明提供了其它的癌症治疗方法，如放射疗法和其它的化学疗法，其包含但不限于：抗代谢物、依托泊苷、阿霉素、紫杉酚、长春新碱、环磷酰胺、丝裂霉素 C、拓扑异构酶 I、拓扑异构酶 II 抑制剂（阿霉素、拓扑替康（topotecan）、喜树碱（camptothecin）和药薯）、含铂化合物（顺氯氨铂、卡铂（carboplatin）、替匹法尼（tipifarnib）（R115777）、SCH66336、埃罗替尼（erlotinib）、吉非替尼片（gefitinib）、和吉妥单抗（gemtuzumab ozogamicin），它们可以与 VNP40101M 或其等价物一起使用。当 VNP40101M 与这些疗法结合使用时提供增效作用。

本发明的目的具体可以通过以下措施达到：

本发明提供了一种治疗患者肿瘤的方法，包括给患者施用有效量的：

(1) VNP40101M，或其等价物；和(2)核苷，或核苷类似物。

本发明还提供一种抑制肿瘤细胞生长方法，包括将肿瘤细胞接触有效量的：(1) VNP40101M，或其等价物；和(2)核苷，或核苷类似物。

VNP40101M - Cloretazine™

VNP40101M 是 SHPs 中的一种代表形式。如本文所用的，VNP40101M 包含其本身、它的盐或在体内能够产生相同或相似作用其它的前体药物

形式。前体药物是通过正常代谢过程能够转化成其活性形式的非活性前身。

VNP40101M 和其等价物在本领域是已知的。参考如美国专利号：6,855,695 B2，发行于 2005 年 2 月 15 日。其它的 SHPs 也可以用于本发明。

本发明涉及癌症的治疗，包括给患者施用其所需的有效量的与核苷组合的 VNP40101M。

这些药剂可以同时或按顺序给药。

在一个实施方案中，患者是动物。在另一实施方案中，患者是人。

#### 核苷及其类似物

如本文所用，核苷类似物被定义为能够与核苷本身产生基本相同效果的类似物。核苷类似物能够抑制 DNA 合成或向 DNA 中的插入，如将氮胞苷、克拉屈滨 (cladribine)、地西他滨 (decitabine)、吉西他滨 (gemcitabine)、颈基嘌呤、硫鸟嘌呤、氟达拉宾 (fludarabine)、氯法拉宾 (clofarabine)、troxacitabine、和戊糖苷用于与 VNP40101M 结合治疗恶性肿瘤。

阿糖胞苷，细胞周期特异性抗代谢产物，是治疗 AML 的最有效的药物。阿糖胞苷被胞内磷酸化且被结合到 DNA 中。通过抑制 DNA 聚合酶和 DNA 合成，阿糖胞苷被预言抑制 DNA 修复和增强 VNP40101M 的细胞毒性。

#### 放疗和其它化学疗法

其它的癌症治疗如放疗或其它的化疗包括但不限于抗代谢产物、依托泊苷、阿霉素、紫杉酚、长春新碱、环磷酰胺、丝裂霉素 C、拓扑异构酶 I、拓扑异构酶 II 抑制剂 (阿霉素、拓扑替康、喜树碱和药薯)、含铂化合物 (顺氯氨铂、卡铂)、替匹法尼 (R115777)、SCH66336、埃罗替尼、吉非替尼片、和吉妥单抗，它们可以与 VNP40101M 或其等价物一起使用。当 VNP40101M 与这些疗法结合使用时提供增效作用。

本发明的一方面涉及癌症的治疗，包含给患者施用所需的有效量的与至少一种治疗药剂组合的 VNP40101M。在一个实施方案中，药剂是核苷或核苷类似物。

本发明优选的实施方案为固体恶性肿瘤、白血病、淋巴瘤的治疗。

在另一个实施方案中，癌症是急性骨髓白血病（AML）。

本发明中所用的 VNP40101M 和核苷或其类似物的量为治疗癌症的有效量。一般，根据所用的化合物、治疗的肿瘤类型、活性化合物在治疗组织中的定位能力、施药方式和化合物在患者中的药物动力学，本发明中的 VNP40101M 有治疗效果的量为小于治疗患者体重的约 0.05mg/kg 至约 100mg/kg，或更多。

VNP40101M 的优选给药量为一次约 0.5mg/kg (17.5mg/m<sup>2</sup>) 至约 50mg/kg (1750 mg/m<sup>2</sup>) 或更多。核苷或其类似物优选给药量为一次约 0.1 mg/kg (3.5mg/m<sup>2</sup>) 至约 150 mg/kg (5250mg/m<sup>2</sup>) 或更多，优选给药量为 1mg/kg 至 100mg/kg。根据治疗疾病的状态，治疗持续的时间可以为 1 天或几天或几个月或更长（几年）。

在更加优选的实施方案中，VNP40101M 是以 1mg/kg 至 20mg/kg 的剂量向患者给药，而核苷是 10mg/kg 至 80mg/kg。在另一个优选的实施方案中，核苷是阿糖胞苷（AraC）且剂量是 20mg/kg 至 60mg/kg。还有，在另一个实施方案中，VNP40101M 的剂量为 100-1000mg/m<sup>2</sup>，同时 AraC 的剂量为 500-5000mg/m<sup>2</sup>。

#### 协同作用

本发明提供了一种包含一定量的 VNP40101M 或其等价物的组合物，VNP40101M 或其等价物与核苷或其类似物组合使用治疗肿瘤时能够产生协同作用。

本发明提供了一种包含一定量的核苷或其类似物的组合物，核苷或其类似物与 VNP40101M 组合使用治疗肿瘤时能够产生协同作用。

如下面的实施例的证明，VNP40101M、其等价物或核苷（它的类似物）的有效量能够常规测定。这些药剂的组合可以静脉、皮下、肌肉、腹膜内或口服递送。其它的给药方式如吸入也可以应用。

本发明将通过下面的实施例更好地理解，无论如何，本领域技术人员将很容易地领会到讨论的特定的方法和结果仅仅是本发明的解释，其在下面的权利要求中被更全面地描述。

本发明的优点是：

对宿主具有低毒性，由 VNP40101M 释放的甲基异氰酸酯具有抑制各种 DNA

修复酶的能力，具有更好的抗肿瘤活性。

另外，VNP40101M 在越过脑血管屏障（BBB）和根除颅内植入的白血细胞（>6.54 对数细胞杀死量）、对抗 BCNU 效力是有效果的。

### 具体实施方式

**实施例 1、VNP40101M 和 AraC（阿糖胞苷）对体外肿瘤细胞系的细胞毒性**

通过细胞活性分析测定了 VNP40101M 和 AraC 的组合物对 L1210 白血病的细胞毒性。将细胞暴露于单独的或与各种浓度 AraC 组合的 VNP40101M。72 小时后，通过测量线粒体 RNA 氧化还原酶活性来定量剩余的存活的细胞数量。所用的 AraC 和 VNP40101M 的浓度为 0.75-6 $\mu$ M。对显示 AraC 和 VNP40101M 联合效果的有效剂量分析（结合指数）进行分析。0.75-0.8 和 0.1-0.3 的联合指数分别显示中度协同和强烈协同（Chou and Talalay, Adv. Enz. Regul., 22, 27 - 55, 1984）。在 AraC 存在的情况下评价 VNP40101M 针对 L1210 白血病的细胞毒性效果，表 1 显示了 CLOETAZINE 与 AraC 对白血病的协同作用。

表 1: L1210 细胞暴露于 AraC 和 VNP40101M 的组合物 1 小时后的测量结果。

AraC ( $\mu\text{M}$ )	VNP40101M ( $\mu\text{M}$ )	受影响的部分	联合指数*
0.75	6	0.955	0.243
0.75	3	0.915	0.189
0.75	1.5	0.904	0.121
0.75	0.75	0.886	0.089
1.5	6	0.962	0.246
1.5	3	0.918	0.221
1.5	1.5	0.918	0.147
1.5	0.75	0.903	0.122
3	6	0.967	0.271
3	3	0.928	0.273
3	1.5	0.925	0.209
3	0.75	0.924	0.175
6	6	0.958	0.405
6	3	0.943	0.357
6	1.5	0.933	0.325
6	0.75	0.925	0.312

## 实施例 2、VNP40101M 和氟达拉宾对体外肿瘤细胞系的细胞毒性

通过细胞活性分析来测定 VNP40101M 和核苷类似物的组合物对肿瘤细胞系的细胞毒性。将多个白血病细胞系 (L1210 和 HL-60) 和淋巴瘤细胞系 (Raji 和 Namalwa) 暴露于单独的或与各种浓度氟达拉宾组合的 VNP40101M。72 小时后, 通过测量线粒体氧化还原酶活性定量剩余的存活的细胞数量。所用的氟达拉宾浓度为 0.1-100 $\mu\text{M}$ , 所用的 VNP40101M 浓度为 0.1-100 $\mu\text{M}$ 。对显示 VNP40101M 和氟达拉宾联合效果的有效剂量分析 (结合指数) 进行分析。0.75-0.8 和 0.1-0.3 的结合指数分别显示中度协同

和强烈协同。

### 实施例 3、VNP40101M 和 AraC 对白血病的体内抗肿瘤活性

在 0 天将 0.2mL 磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中的  $1 \times 10^6$  的 L1210 细胞腹膜内 (ip) 接种至 80 只 Balb/c $\times$ DBA/2 (CD2F1) 雌性小鼠。将小鼠随机地分成 6 组, 每组 10 只小鼠。这些动物不被治疗或是在第 1 天用 5 或 10mg/kg 的单次大丸剂量 VNP40101M 腹膜内给药治疗, 在第 1、3、5、7 和 9 天一起使用或不使用 AraC (50mg/kg, ip)。在试验期间, 每日观察小鼠数次。将接种 L1210 细胞后存活 60 天以上的小鼠确定为长期生存者。产生了 Kaplan-Meier 孔, 并用学生 T-测试 (student T-test) 分析动物的生存时间。显著性定义为  $P < 0.05$ 。

表 2 显示对小鼠进行的  $1 \times 10^6$  的 L1210 白血病细胞的腹膜接种导致了腹水的快速发展, 接着未治疗控制的所有动物在 18 天内死亡而用 AraC 治疗控制的动物在 30 天内死亡。以 5 和 10mg/kg 的 VNP40101M 单次剂量治疗分别增加长期生存者到 50% 和 90%。组合治疗要好于单试剂的治疗效果。5 和 10mg/kg 的 VNP40101M 加上 AraC 的治疗分别增加了长期生存者到 80 和 100%。我们的结果表明 VNP40101M 显著地增强了 AraC 的抗肿瘤效果。

表 2、单试剂和组合试剂的治疗效果比较

组	长期生存者 (%)	P 值*
1. 未治疗控制	0	
2. AraC 50mpk	0	
3. VNP40101M 5mpk	50	
4. VNP40101M 10mpk	90	
5. AraC 50mpk+VNP40101M 5mpk	80	0.0024
6. AraC 50mpk +VNP40101M 10 mpk	100	0.0022

\*VNP40101M 以相应的剂量对应于组合治疗

### 实施例 4、VNP40101M 和氟达拉滨对白血病的体内抗肿瘤活性

在 0 天将 0.2mL 磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中的  $3 \times 10^6$  的 L1210 细胞腹膜内 (ip) 接种至 80 只 Balb/c $\times$ DBA/2 (CD2F1) 雌性小鼠。将小鼠随机



地分成6组,每组10只小鼠。这些动物不被治疗或在第1天用5或10mg/kg的单次大丸剂量 VNP40101M 腹膜内给药治疗,在第1—9天中的几天一起使用或不使用氟达拉宾 (70mg/kg, ip)。在试验期间,每日观察小鼠数次。将接种 L1210 细胞后存活 60 天以上的小鼠确定为长期生存者。产生了 Kaplan-Meier 孔,用学生 T-测试分析动物的生存时间。显著性定义为  $P < 0.05$ 。

表 3 显示对小鼠进行的  $3 \times 10^6$  的 L1210 白血病细胞的腹膜接种导致了腹水的快速发展,接着未治疗控制的所有动物在 18 天内死亡而用氟达拉宾治疗控制的动物在 30 天内死亡。用 10mg/kg 的 VNP40101M 单次剂量治疗增加了长期生存者到 40%,组合治疗要好于单试剂的治疗效果。10mg/kg 的 VNP40101M 加上氟达拉宾的治疗增加了长期生存者至 90%。我们的结果表明 VNP40101M 显著地增强了氟达拉宾的抗肿瘤效果。

表 3、单一试剂和组合试剂的治疗效果比较

组	长期生存者 (%)	P 值*
1. 未治疗控制	0	
2. Fluda 70mpk	0	
3. VNP40101M 5mpk	0	
4. VNP40101M 10mpk	40	
5. Fluda 70mpk+VNP40101M 5mpk	0	
6. Fluda 70mpk +VNP40101M 10 mpk	90	0.0025

#### 实施例 5、VNP40101M 和 AraC 治疗 AML 患者的用途

以  $0.5-4.0\text{gm}/\text{m}^2/\text{day}$  的剂量在 1-6 天静脉连续输注给药 AraC。优选地,在 3-4 天给药 AraC 的剂量为  $1.0-2.0\text{gm}/\text{m}^2/\text{day}$ 。第 1-3 天 AraC 输注后给药 VNP40101M 15-30 分钟以上, VNP40101M 的剂量为  $200-700\text{mg}/\text{m}^2$ 。优选地, AraC 输注后 1 天给药 VNP40101M,而且剂量为  $450-650\text{mg}/\text{m}^2$ ,重复多次循环治疗。

#### 实施例 6、VNP40101M 和氯法拉滨治疗 AML 患者的用途

以  $10-50\text{gm}/\text{m}^2/\text{day}$  的剂量在 1-6 天静脉连续输注给药氯法拉滨。优选地,连续 5 天给药氯法拉滨的剂量为  $30-40\text{gm}/\text{m}^2/\text{day}$ 。氯法拉滨给药

之前、期间、或之后单次大剂量注射给药 VNP40101M 15-60 分钟以上，VNP40101M 的剂量为  $200-700\text{mg}/\text{m}^2$ ，优选地，VNP40101M 的剂量为  $450-650\text{mg}/\text{m}^2$ ，而且，重复多次循环治疗。

#### 实施例 7、VNP40101M 和替匹法尼治疗 AML 患者的用途

以  $200-800\text{gm}/\text{剂}$ 、每天 1-3 剂口服给药替匹法尼直到 28 天。优选替匹法尼以  $600\text{gm}/\text{剂}$  给药，每天 2 剂，连续 28 天。替匹法尼给药之前、期间、或之后单次大剂量注射给药 VNP40101M 15-60 分钟以上，VNP40101M 剂量为  $200-700\text{mg}/\text{m}^2$ ，优选地，VNP40101M 的剂量为  $450-650\text{mg}/\text{m}^2$ ，重复多次循环治疗。

## 参考文献

1. Shyam K, Cosby LA, Sartorelli AC: 作为抗肿瘤药剂的 N-N' -二(芳基磺酰)肼的合成及评价, 药物化学期刊, 28:525-7, 1985
2. Shyam K, Furubayashi R, Hrubiec RT 等: 1,2-二(芳基磺酰)肼。 2. 芳基磺酰和芳烷基磺酰取代物对抗肿瘤和烷基化活性的影响。药物化学期刊, 29:1323-5, 1986
3. Shyam K, Hrubiec RT, Furubayashi R 等: 1,2-二(磺酰基)肼。 3. 结构修饰对抗肿瘤活性的影响。药物化学期刊, 30:2157-61, 1987
4. Shyam K, Penketh PG, Divo AA 等: Synthesis and evaluation of 作为抗肿瘤药剂的 1-酰基-1,2-二(甲磺酰基-2-(2-氯乙基)肼的合成和评价。药物化学期刊, 36:3496-502, 1993
5. Shyam K, Penketh PG, Loomis RH 等: 抗肿瘤药 2-(甲酰胺基)-1,2-二(甲磺酰基)-1-(2-氯乙基)-肼。药物化学期刊, 39:796-801, 1996.
6. Penketh PG, Shyam K, Sartorelli AC: 1,2-二(磺酰基)肼和氯乙基亚硝基脲通过肿瘤抑制对 DNA 损伤的比较。生化药理学, 59:283-91, 2000
7. Pratviel G, Shyam K, Sartorelli AC: 1,2-二(磺酰基)肼对 Mer<sup>+</sup>和 Mer<sup>-</sup>表型人细胞的毒性和 DNA 损伤影响。癌症生化生物物理学, 10:365-75, 1989
8. Penketh PG, Shyam K, Sartorelli AC: 烷基化药剂的抗性机理。癌症治疗研究, 87:65-81, 1996
9. Penketh PG, Shyam K, Sartorelli AC: 1,2-二(磺酰基)-1-烷基肼的分解机理和影响水性稳定性的结构因子的研究, 药物化学期刊, 37:2912-7, 1994

10. Giles F, Thomas D, Garcia-Manero G 等: VNP40101M, 新的磺酰基胍烷化剂对顽固性白血病患者的 I 期和药物动力学研究, 临床癌症研究, 10(9):2908-2917, 2004
11. Murren J, Modiano M, Kummar S 等: VNP40101M, 新的烷化剂对晚期或转移的癌症患者的 I 期和药物动力学研究, 新药发现, 23(2):123-135, 2005
12. Baumann RP, Shyam K, Penketh PG 等: 1,2-二(甲磺酰基)-1-(2-氯乙基)-2-[(甲基氨基)羰基]胍 (VNP40101M): II. O<sup>6</sup>-烷基鸟嘌呤-DNA 烷基转移酶在细胞毒性中的作用。癌症化学治疗剂药理学, 53(4):288-295, 2004
13. Mao J, Xu Y, Wu D 等: 新 DNA 烷化剂 VNP40101M 在大鼠中的药动学、质量平衡、和组织分布, AAPS PharmSci 4(4)24, 2002
14. Lee KC, Almassian B 和 Noveroske J: 1,2-二(甲磺酰基)-1-(2-氯乙基)-2-[(甲基氨基)羰基]胍 (VNP40101M), 具有潜在的抗肿瘤活性的新的烷化剂在大鼠和狗内静脉施药的毒性评价。Int J Toxicol. 21(1):23-38, 2002